

学校编码：10384
学号：200126012

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

海藻真菌活性菌株的初筛及 3 株海洋
真菌次级代谢产物的初步研究

The Screening for Bioactive Strains from Algicolous
Fungi and the Preliminary Study on the Secondary
Metabolites from three Marine Fungi

张 决

指导教师姓名：郑忠辉 教授

专 业 名 称：微 生 物 学

论文提交日期：2004 年 9 月 20 日

论文答辩日期：2004 年 9 月 19 日

学位授予时间：

答辩委员会主席：刘月英 教授

评 阅 人：刘月英 教授

方金瑞 研究员

2004 年 9 月

目 录

原创性声明

摘要.....

英文摘要..... IV

前言 1

- 一、海洋微生物次级代谢产物研究概况 3
- 二、海洋真菌次级代谢产物研究概况..... 5
- 三、海藻真菌次级代谢产物研究 8
- 四、本课题研究的目的、内容和意义 17

材料与方法 19

- 一、材料..... 19
- 二、方法..... 23

结果与分析 33

- 一、海藻真菌的分离及其生物活性的研究..... 33
 - 1.海藻真菌的分离 33
 - 2.海藻真菌的抗肿瘤活性 34
 - 3.海藻真菌的抗菌活性 38
 - 4.海藻真菌的抑制乙酰胆碱酯酶活性 42
- 二、LC13 菌株的鉴定 45
- 三、LC13 菌株代谢产物的研究..... 46
 - 1.菌株的发酵及代谢产物的分离纯化 46
 - 2.化合物的结构解析 48
 - 3.化合物的生物活性检测 55
- 四、HLY2 菌株胞内代谢产物的研究 56
 - 1.菌株的发酵及代谢产物的分离纯化 56
 - 2.化合物的结构解析 56
 - 3.化合物的生物活性检测 60
- 五、PT2 菌株胞内代谢产物的研究 60
 - 1.菌株的发酵及代谢产物的分离纯化 60
 - 2.化合物的结构解析 60
 - 3.化合物的生物活性检测 61

讨论与结论	63
一、培养基对海藻真菌活性菌株初筛的影响	63
二、海藻真菌的生物活性	64
三、3 株海洋真菌代谢产物的初步研究	65
四、结论与展望	70
参考文献	73
致谢	84
附录	85

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除论文已经注明所引用的内容外，本论文不包括任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果，对本文的研究工作做出重要贡献的个人和集体，已经在文中以明确的方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

摘要

海洋真菌是海洋微生物的重要组成部分。这类真菌种类多，分布广，既可生活在水体和底泥中，又可栖息在海绵、珊瑚、海鞘、海藻、红树植物等不同的海洋动植物体上。国内外对海洋真菌的系统研究起步较迟，对其代谢产物化学及生物活性的研究水平远不及海洋细菌和放线菌，但近几年来研究进展较快，目前已从海洋真菌中分离到近 300 个具有抗菌、抗肿瘤等不同生物活性的新化合物。这些化合物大多数来源于生活在海洋动植物体上的真菌，其中从海藻真菌中获得新活性化合物的概率最高。已有的研究结果充分表明海洋真菌尤其是海藻真菌中蕴藏着许多具有生物活性的新化合物，是开发新药的宝贵资源。

我国海藻种类非常丰富，目前已鉴定的海藻就有 2500 多种，在这些海藻中广泛分布着各种海藻真菌，具有得天独厚的海藻真菌资源优势。然而，国内对海藻真菌的研究极少，迄今为止鲜见对海藻真菌活性物质的研究报道。

本文对采自于福建漳州浯屿岛、漳州浮宫海岸潮间带和漳州东山岛的 14 种大型海藻中的海藻真菌进行了较为系统的分离，从中筛选抗菌、抗肿瘤和抑制乙酰胆碱酯酶活性物质产生菌并对几株高活性菌株的次级代谢产物进行了初步研究，旨在发掘具有潜在应用前景的活性菌株及其代谢产物，为海藻真菌资源的利用及开发新的微生物药物奠定基础。

从 14 种海藻样品中共分离得到 81 株海藻真菌。采用 PD 和 GPY 2 种液体培养基进行发酵，分别以 MTT 法和纸片法对这些菌株发酵液乙酸乙酯抽提物的抗肿瘤活性及抗菌活性进行测定。结果表明，有 49 株真菌对 KB 和/或 Raj i 细胞有显著抑制作用，占供测菌株的 60%；

有 47 株对至少一株指示菌有显著抑制作用，占供测菌株的 58%。采用改进的 Ellman 氏法对其中 65 株海藻真菌发酵液乙酸乙酯抽提物的抑制乙酰胆碱酯酶活性进行检测，发现有 10 株菌株可产生 AChE（乙酰胆碱酯酶）抑制剂，占供测菌株的 15%。

对两株海藻真菌 LC13（黑孢属）和 PT2（木霉属）的代谢产物进行了初步的研究。采用萃取、VLC、硅胶柱层析、凝胶柱层析、HPLC 和重结晶等分离纯化方法从 LC13 菌株中分离到了 7 个单体化合物（Z1、Z3-Z6、Z8 和 Z9）。Z3、Z8 的结构分别鉴定为 5,8-表二氧麦角甾-6,9(11),22-三烯-3-醇和谷甾醇。Z6 的结构鉴定为 5,11-Dimethyl-1,2,7,8-tetrahydro-3,9-dioxo-6b,12b-diaza-perylene，是一个新化合物。其它 4 个化合物的结构尚在解析中。从 PT2 菌株的菌体中分离到的组分 Z14，初步确定含有两个环肽，分别由 9 个氨基酸残基和 11 个氨基酸残基组成。由于其结构复杂，其氨基酸连接顺序尚未能确定，确切的结构还在解析中。

本文还从一株木栖真菌 HLY2（菜豆间座壳菌）菌体中分离并鉴定了 Z10 和 Z15 两个化合物。Z10 为麦角甾醇；Z15 初步确定为 1-氢,1-氢-[2,2']二嘧啶-4,4'-二酮，是新化合物。

对以上化合物进行抗肿瘤、抗菌和抗乙酰胆碱酯酶的活性分析。经检测，Z3、Z8 和 Z9 对 Raji 肿瘤细胞株有微弱的抑制作用， IC_{50} 分别为 150、122.1 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 。新化合物 Z15 对 MG-63 肿瘤细胞株的 IC_{50} 为 151.2 $\mu\text{g/mL}$ ，对交链孢霉的 MIC 为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。组分 Z14 对 KB、Raji、Hela 和 MG-63 肿瘤细胞株的 IC_{50} 分别为 0.9、6.4、25 和 10.5 $\mu\text{g/mL}$ ，显示了良好的抗肿瘤活性；此外，它还具有一定的抗菌活性，对枯草杆菌的 MIC 为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

本文的工作表明，海藻真菌中蕴藏着丰富的抗菌、抗肿瘤和抗乙酰胆碱酯酶活性物质，是开发新药的潜在资源。

关键词：海藻真菌 代谢产物 生物活性

Abstract

Marine microorganisms have become an important source of pharmacologically active metabolites. More specifically, fungi from the marine environment have shown great potential. There are innumerable kinds of marine fungi, which distribute widely in all kinds of environment, such as sponge, alga, coral, mangrove and so on.

Today there are about three hundreds new compounds derived for marine fungi. Marine fungi obtained from either sponges, algae, or wood substrates account for the majority of new compounds reported from marine fungi. Interestingly, sponge-derived fungi account for the largest number (33%) of total compounds and have the overall highest number of novel metabolites. Algicolous fungi are second accounting for 24% of the total number of compounds, but represent a slightly higher percentage (27%) of new metabolites. Additionally, the ratio of new metabolites to known metabolites is much higher for algicolous fungi as compared to sponge-derived fungi. Although algicolous fungi is such a promising resource, it's relatively little investigated.

Fourteen marine algae samples investigated in this study originated from different intertidal zones of Fujian Province, China. From those algae, eighty one strains of algicolous fungi were isolated by using selective media. Those fungi were cultured on PD medium and GPY medium. Organic extracts were screened by the way of MTT and Disk diffusion susceptibility. The results showed that 49 strains (60% of the total isolates) could inhibit the growth of Raji and/or KB tumor cell lines, while 47 strains (about 58% of the total isolates) showed antimicrobial

activities against one or more sensitive microbes (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*). At the same time, 65 strains of the all strains were screened for acetylcholinesterase inhibitors. As a result, 10 strains could inhibit acetylcholinesterase.

Two algicolous fungi LC13(*Nigrospora* sp.)and PT2(*Trichoderma* sp.) were selected to study their secondary metabolites. Employing VLC (Vacuum Liquid Chromatography),Silica Column Chromatography, Dextran gel Column Chromatography,HPLC and re-crystal, we isolated seven compounds (Z1,Z3-Z6,Z8 and Z9) from LC13. The structures of Z3 and Z8 were identified as 5,8-epidioxy-5 α ,8 α -stigmasta-6,9(11),22-trien-3 β -ol and β -sitosterol individually. The new compound,Z6, was identified as 11-Dimethyl-1,2,7,8-tetrahydro-3,9-dioxo-6b,12b-diazaperylene. The structure elucidating of other compounds was undergoing. From another algicolous fungi PT2(*Trichoderma* sp.), a mixture(Z14) of two cyclopeptides was gained. The amino acid composition in Z14 had been measured. With the aid of MS and NMR, the structure elucidating of Z14 was undergoing.

We also studied the metabolites from a lignicolous fungi HLY2(*Diaporthe phaseolorum*) .As a result, we got and elucidated two compounds(Z10 and Z15),their structure were identified as ergosterol and 1H,1'H-[2,2']Bipyrimidinyl-4,4'-dione respectively. Between then,Z15 is a new compound.

In the later investigation of antitumor, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities, Z3,Z8 and Z9 could feebly

inhibit the growth of Raji cell line, the value of their IC_{50} was 150 ,122.1 and 100 μ g/mL respectively. The new compound ,Z15, showed antitumor activity against MG-63 cell line with IC_{50} 151.2 μ g/mL. Also it showed antimicrobial activity against *Alternaria* sp.with MIC 50 μ g/mL.

Z14 demonstrated significantly bioactivity against four human tumor cell lines(KB , Raji , Hela and MG-63), their IC_{50} were 0.9 , 6.4 , 25 and 10.5 μ g/mL individually. Its MIC against *Bacillus subtilis* is 100 μ g/mL.

Our study indicated that algicolous fungi was reliable resource for metabolites with antitumor, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities.

Key words: Algicolous fungi, secondary metabolites, bioactivity

前言

新药主要来源于天然产物^[1-2]和经化学合成或修饰^[3-4]的化合物。其中天然产物一直是新药最重要的来源。1981-2002 年,在被作为药物的小分子新化学实体 (NCEs, New Chemical Entities) 中有 61% 与天然产物有关 (图 1)。在所有的药物中,有 55% 直接或间接来源于天然产物。例如,在癌症治疗方面,61% 的药物与天然产物有关;在抗细菌方面,90 个药物中,有 71 个是建立在天然产物的基础上的 (表 1)。以上数据表明,天然产物在药物先导化合物的发现中起着举足轻重的作用。

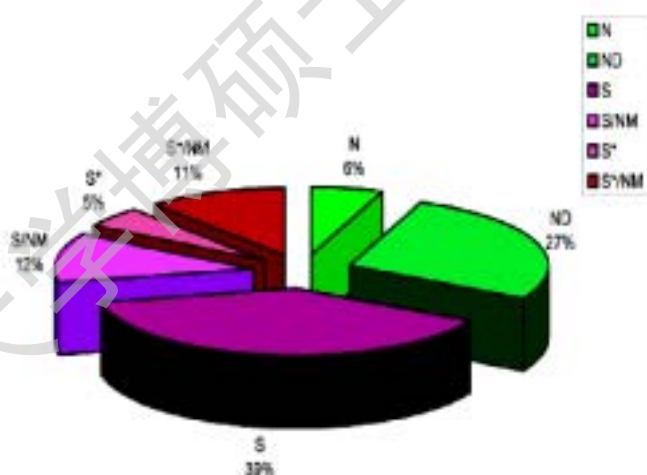


图 1. 1981-2002 年所有的小分子新化学实体(共 877 个)^{a[5]}

Fig.1 All small molecule new chemical entities, 1981-2002 ($N = 877$)

^a : N : 天然产物; ND : 来源于天然产物, 通常经过半合成的化学修饰; S : 完全化学合成; S* : 完全化学合成, 但是药效团来自天然产物; NM : 是指根据从天然产物获得的信息/知识进行药物设计; S/NM : 完全化学合成, 并结合了NM; S*/NM : 利用天然产物药效团进行完全化学合成, 同时结合了NM。

表 1 1981-2002年新化学实体及其来源^{b[5]}

Tab.1 New Chemical Entities and Medical Indications by Source of Compound, 1981-2002

indication	total	origin of drug							
		B	N	ND	S	S/NM	S*	S*/NM	V
analgesic	15				11	2	2		
anesthetic	5				5				
anti-Alzheimer's	4		1			3			
anti-Parkinsonism	10			2		4		4	
antiallergic	15		1	3	11				
antianginal	4				4				
antiarrhythmic	15		1		12			2	
antiarthritic	12	2		1	3	6			
antiasthmatic	12			2	2	6		2	
antibacterial	90		9	61	19			1	
anticancer	79	12	9	21	17	8	7	3	2
anticoagulant	16	3		12			1		
antidepressant	21				7	12		2	
antidiabetic	23	12	1	2	3	4	1		
antiemetic	7				1			6	
antiepileptic	10			1	6		2	1	
antifungal	24	1		2	18	3			
antiglaucoma	13			4		5	1	3	
antihistamine	12				12				
antihyperprolactinemia	4			4					
antihypertensive	75			1	26	14	2	32	
antiinflammatory	50	1		13	36				
antimigraine	10				2	1		7	
antiparasitic	13		2	5	4		2		
antipsoriatic	4			3				1	
antipsychotic	7				3	2		2	
antithrombotic	28	13	1	5	2	5		2	
antiulcer	32	1	1	12	18				
antiviral	35	2		1	7	1	17	7	
anxiolytic	10				8	2			
benign prostatic hypertrophy	4		1	2		1			
bronchodilator	8			2				6	
calcium metabolism	17			8	8	1			
cardiotonic	13			3	2	3		5	
chelator & antidote	5				3	2			
contraception	6			6					
diuretic	4				4				
gastroprokinetic	4				1	2		1	
hematopoiesis	5	5							
hemophilia	9	9							
hepatitis	17	7					1		9
hormone	20	10		10					
hormone replacement therapy	4			4					
hypnotic	11				11				
hypcholesterol-emic	9		3	1	2			3	
hypolipidemic	8		1		7				
immunostimulant	10	4	3	2	1				
immunosuppressant	10	4	5	1					
muscle relaxant	10			4	2	1	3		
neuroleptic	10				2	6		2	
nootropic	8			3	5				
platelet aggregation inhibitor	4			3		1			
respiratory distress syndrome	6	3	1		1	1			
vasodilator	6			3	2	1			
vulnerary	5	2		2	1				
grand total	868	91	40	209	289	97	39	92	11

^b : B : 生物大分子 ; V : 疫苗 , 其余参见图 1。

人类开发天然产物药物的重点一直集中在陆生生物资源，现有的天然产物药物大多数也都来自陆生生物^[5-8]。然而，由于对陆生生物资源的长期研究开发，目前从陆生生物代谢产物中发现新药或先导化合物的几率大幅度地下降，例如，近年来从陆生微生物分离到的活性代谢产物有90%以上都是已知的化合物^[9]。因此，自上世纪60年代来，人们开始重视利用海洋生物资源进行天然药物开发^[10-13]。

一、 海洋微生物次级代谢产物研究概况

近几十年来，已从海藻、海参、海绵、珊瑚等不同的海洋动植物中分离到大约 1000 种具有不同生物活性的新化合物^[14-16]。其中有不少化合物具有很好的药用前景，少数化合物已经产业化^[17]。然而，大多数海洋动植物不仅资源量非常少，而且活性物质含量低、结构复杂，因此直接利用这些海洋生物资源进行产业化开发或采用化学合成生产均受到限制^[18]。

海洋微生物是海洋生物的重要成员，它与海洋动植物比较具有以下优点：1、在海洋中的分布范围更广，物种多样性更加丰富^[19-20]。2、次级代谢产物化学类型更加多样，既可产生与海洋动植物相似或相同的代谢产物，又可合成结构独特的化合物。近年来的研究还表明，一些海洋动植物产生的活性代谢产物实际上是由与其共附生的海洋微生物所产生的^[21-22]。3、可以利用现代微生物发酵技术进行生产，具有不破坏海洋生态资源、无原材料后顾之忧、易实现产业化等优点^[23-24]。因此，海洋微生物被认为是最具开发前景的可持续性利用药源。目前国外许多研究单位及大型制药企业已将海洋药物的研发重点转向海洋微生物。

近年来，有关海洋微生物天然产物的报道明显增加(图 2、3)，已从海洋微生物中分离到几百个结构新颖，具有抗菌、抗肿瘤、抗

病毒、降血压、免疫调节等活性的代谢产物^[25-28]。

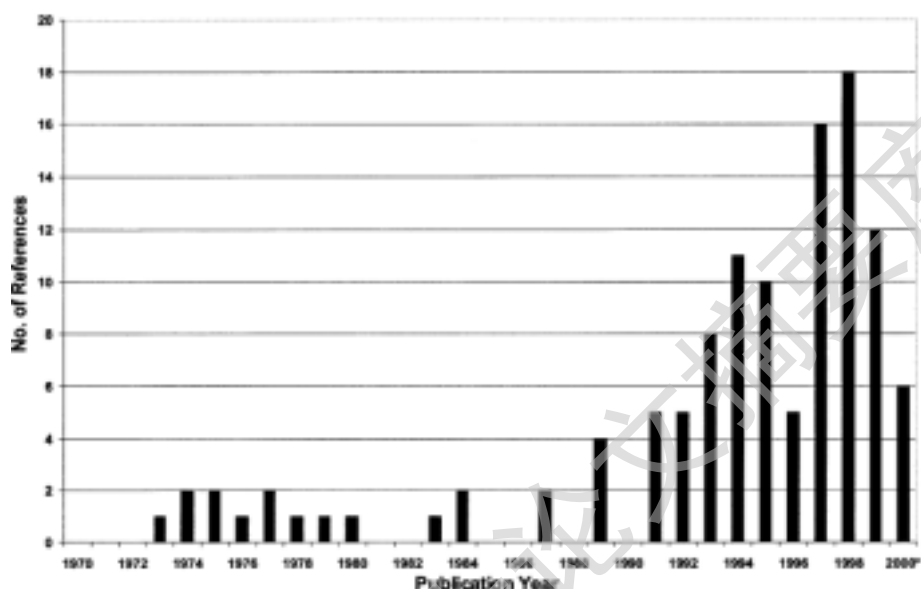


图 2 1970 ~ 2000年1月有关海洋原核生物新化合物的文献数目^[29]。

Fig.2 Novel organic molecules reported from marine prokaryotes, cited in literature through January 5, 2000.

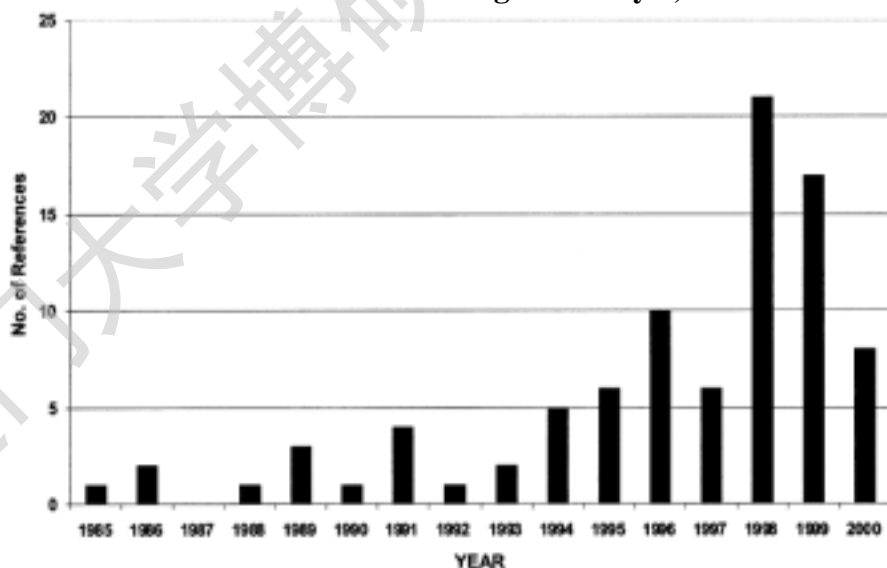


图 3 1985 ~ 2000年10月有关海洋真菌新化合物的文献数目^[29]

Fig.3 Novel organic molecules reported from marine fungi, cited in literature through October 2000

二．海洋真菌次级代谢产物研究概况

海洋微生物包括海洋细菌、海洋放线菌、微藻和海洋真菌。国内外对海洋细菌和放线菌的活性天然产物的研究起步较早，研究较深入，发现的新化合物的数量也较多。相比之下，对海洋真菌的研究进展较缓慢，据报道从 1970 年至 1993 年从海洋真菌中发现的新化合物不到 35 个，直到 1994 年开始，发现新化合物的速率才有所增加，进入较快速的发展阶段（图 4）^[28]。

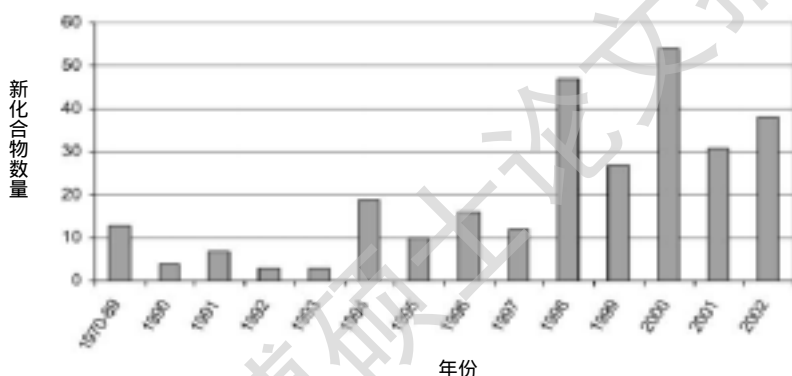


图 4 每年报道的海洋真菌新化合物数量

Fig.4 Number of new compounds reported annually

目前已分离的化合物有 70% 是来源于生长在海绵、海藻和腐木上的真菌。其中，海绵真菌来源的占 33%，海藻真菌来源的占 24%（图 5）^[28]。而在所获得的来源于海洋真菌的新化合物中，海绵真菌和海藻真菌来源的分别占了 28% 和 27%（图 6）^[28]。表 2 列出了 2000 年以来从海洋真菌中分离到的部分不同结构类型的代谢产物^[28,30-43]。

海洋真菌代谢产物不但结构类型多样，而且具有广泛的生物活性，目前已报道海洋真菌代谢产物的生物活性除了抗菌、抗肿瘤外，还包括抗病毒、抗氧化、抑制酶活、抑制血小板和调节细胞周期等

活性。

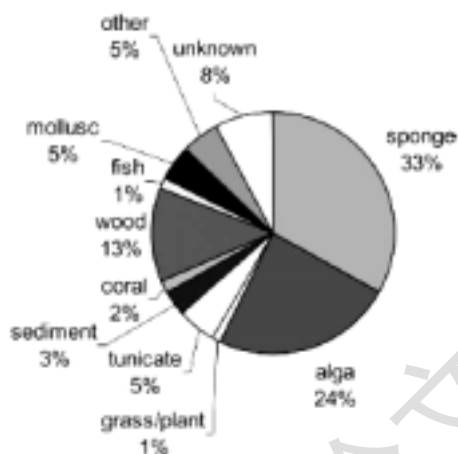


图 5 已报道的所有海洋真菌次级代谢产物的分布

Fig.5 The distribution of all compounds reported from marine derived fungi is shown as a function of the fungal source.

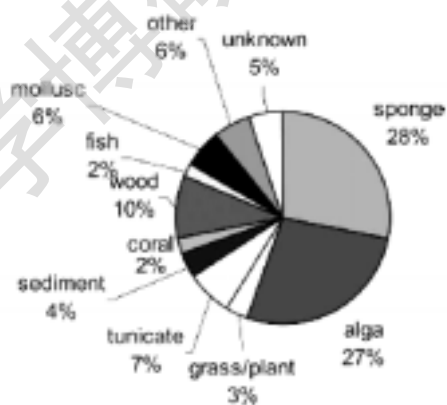


图 6 已报道的来源于海洋真菌的新化合物的分布

Fig.6 The distribution of all new compounds reported from marine derived fungi is shown as a function of the fungal source.

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库